

09/890649

JC05 Re PCT/PTO 03 AUG 2001

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application No. :

U.S. National Serial No. :

Filed :

PCT International Application No. : PCT/EP00/00831

VERIFICATION OF A TRANSLATION

I, Susan POTTS BA ACIS

Director to RWS Group plc, of Europa House, Marsham Way, Gerrards Cross, Buckinghamshire, England declare:

That the translator responsible for the attached translation is knowledgeable in the German language in which the below identified international application was filed, and that, to the best of RWS Group plc knowledge and belief, the English translation of the international application No. PCT/EP00/00831 is a true and complete translation of the above identified international application as filed.

I hereby declare that all the statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the patent application issued thereon.

Date: July 19, 2001

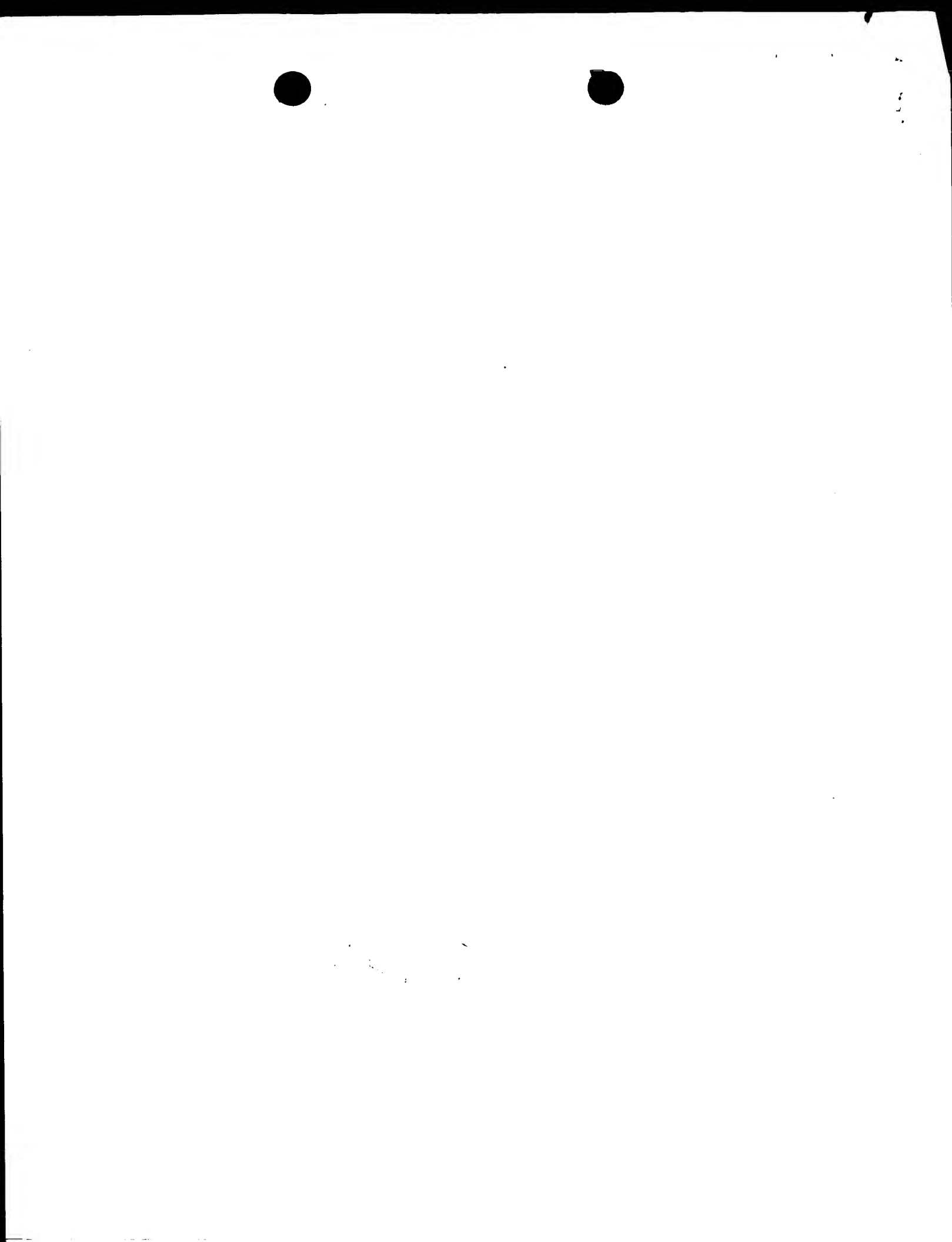
Signature of Director :



For and on behalf of RWS Group plc

Post Office Address :

Europa House, Marsham Way,
Gerrards Cross, Buckinghamshire,
England.



BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

09/890649



| | |
|-------|-------------|
| REC'D | 10 APR 2000 |
| WIPO | PCT |

EP 00 / 831

4

Bescheinigung

Herr Dr. Dr. Michael W. D a h m in München/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren zur Anreicherung von Tumorzellen aus einer Körperflüssigkeit und dazu geeigneter Kit"

am 3. Februar 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 12 N und C 12 Q der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 29. Februar 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Markenzeichen: 199 04 267.5

Wallner

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

LEDERER, KELLER & RIEDERER

Patentanwälte - European Patent Attorneys

DR. A. VAN DER WERTH
(1934 - 1974)

DR. FRANZ LEDERER
Dipl.-Chem. München

DR. GÜNTER KELLER
Dipl.-Biol. München

DR. MICHAEL BEST
Dipl.-Chem. München

ANTON FRH. RIEDERER v. PAAR
Dipl.-Ing. Landshut

80538 MÜNCHEN
Prinzregentenstraße 16
Telefon (089) 21 23 99 0
Telefax (089) 21 23 99 22
E-Mail lederer_keller@compuserve.com

3. Februar 1999
K/T/sm

Dr. Dr. Michael W. Dahm
Gleimstr. 2
81677 München

**Verfahren zur Anreicherung von Tumorzellen aus einer
Körperflüssigkeit und dazu geeigneter Kit**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Anreicherung von Tumorzellen aus einer Körperflüssigkeit sowie ein dazu geeigneter Kit.

Nahezu alle soliden malignen Tumore haben das Potential zur Metastasenbildung. Der Prozeß der Metastasierung beinhaltet die Aussaat maligner Zellen als Mikrometastasen, zumeist auf dem Blut- bzw. Lymphweg in entfernte Organe und die Ausbildung autonomer Tochtergeschwülste. Das Ausmaß der Filiarisierung bestimmt die Prognose eines Tumorleidens.

Die Ansprüche von Tumurvorsorge- oder Nachsorgeprogrammen liegen in der Früherkennung von Primärtumoren bzw. eines Rezidivs oder einer Metastasierung noch bevor Metastasen klinisch manifest werden. Dieses Ziel kann bislang mit den

verfügbaren apparativen Techniken nicht zufriedenstellend erfüllt werden, insbesondere gibt es immer noch eine diagnostische Grauzone zwischen dem Nachweis zirkulierender Tumorzellen und beginnender Metastasenbildung in Organen. Durch die Frühdiagnose zirkulierender maligner Zellen z.B. im peripheren Blut eines Tumornachsorgepatienten könnte frühzeitig, d.h. noch vor einer manifesten Organmetastasierung, eine möglicherweise kurative Immunmodulations- oder Polychemotherapie eingeleitet werden. Die Quantifizierung der Tumorzellen im peripheren Blut vor und nach der Therapie stellt dabei eine wichtige Kontrolle dar.

Da Körperflüssigkeiten im allgemeinen eine Vielzahl unterschiedlichster Zellen enthalten, ist es wünschenswert vor einer Quantifizierung bestimmter Zelltypen wie Tumorzellen, diese anzureichern, um die Quantifizierung zu erleichtern.

Darüber hinaus besteht ein erfolgversprechender Ansatz zur Quantifizierung von Tumorzellen in der Bestimmung der Telomerase-Aktivität einer Körperflüssigkeit. Beispielsweise beschreiben Kim et al. in Science (1994) 266: 2011 einen Assay, mit dem Telomerase-Aktivitäten in Tumorgewebe bestimmt werden können.

Im peripheren Blut weisen jedoch neben Tumorzellen auch hämatopoetische Stammzellen und aktivierte Lymphozyten eine erhöhte Telomerase-Aktivität auf. Aufgrund dieser Tatsache muß vor dem Nachweis einer Telomerase-Aktivität als Marker für disseminierte zirkulierende Tumorzellen im Blut eine Trennung der Telomerase-aktiven hämatopoetischen Stammzellen und Lymphozyten von den Tumorzellen vorgenommen werden.

Neben der Quantifizierung von Tumorzellen in Körperflüssigkeiten kann aber beispielsweise auch deren histologische Untersuchung unter einem Mikroskop von Interesse sein. Darüber hinaus können unter sterilen Bedingungen

isolierte Tumorzellen in Kultur genommen werden, um daraus entsprechende Zelllinien zu etablieren. Zelllinien die von disseminierten zirkulierenden Tumorzellen abstammen anstatt von soliden Tumoren bieten die Möglichkeit, Prozesse der Metastasierung differenzierter untersuchen zu können. Darüber hinaus könnten diese Zelllinien beispielsweise zur Entwicklung von effektiveren Tumortheraeutika beitragen.

Zur Anreicherung von Tumorzellen können beispielsweise mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen Epithelzell-spezifische Antigene, wie z.B. EPCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule), HEA (Human Epithelial Antigen) und Cytokeratin 7/8, epitheliale Tumorzellen markiert werden und an magnetische Partikel oder fluoreszierende Moleküle gekoppelt, dann zur Anreicherung mittels eines Zell-Separators, wie MACS (Magnetic Cell Sorting) oder FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting), verwendet werden. Diese Verfahren haben jedoch den Nachteil, daß nur Tumorzellen epithelialen Ursprungs erfaßt werden, nicht jedoch beispielsweise Melanomzellen. Außerdem sind diese Verfahren aufwendig und teuer.

In den 60er- und 70er-Jahren, als Methoden wie beispielsweise FACS oder MACS noch nicht zur Verfügung standen, wurden Tumorzellen von hämatopoetischen Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte getrennt (J.A. Fleming et al., J. clin. Path. (1967), 20, 145). Entsprechend dieser Daten besitzen Tumorzellen eine spezifische Dichte von 1,040-1,080, während Erythrozyten und polymorphnukleäre Leukozyten eine höhere Dichte aufweisen. Lymphozyten weisen hingegen eine spezifische Dichte im Bereich von 1,060-1,075 auf und überschneiden sich somit mit der spezifischen Dichte von Tumorzellen. Eine vollständige Abtrennung der ebenfalls Telomerase-aktiven Lymphozyten von den Tumorzellen über deren Dichteunterschiede sollte somit nicht möglich sein. So zeigte auch die Verwendung einer Standardlösung zur Isolierung von Lymphozyten, wie z.B. Histoprep[®] mit einer Dichte von 1,077

g/ml, daß Lymphozyten von gesunden Blutspendern mit einer Dichte von bis zu 1,077 g/ml eine Telomerase-Aktivität aufweisen.

Trotz umfangreicher Forschungen ist es bislang nicht gelungen, ein einfaches, schnelles und kostengünstiges Standardverfahren zur Tumorzellanreicherung aus Körperflüssigkeiten zu entwickeln, bei dem auch Telomerase-aktive nicht-Tumorzellen abgetrennt werden.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht somit darin, ein Verfahren zur Anreicherung von Tumorzellen aus einer Körperflüssigkeit zur Verfügung zu stellen, das die obengenannten Nachteile nicht aufweist und insbesondere auch in der Lage ist, nicht-Tumorzellen, die eine Telomerase-Aktivität aufweisen, von den gewünschten Tumorzellen abzutrennen.

Es wurde nun überraschend gefunden, daß diese Aufgabe dadurch gelöst werden kann, daß man ein Zellseparationsmedium mit einer Dichte im Bereich von 1,055 bis $< 1,070$ g/ml mit der Körperflüssigkeit, die die Tumorzellen enthält, überschichtet und zentrifugiert. Durch die Verwendung des speziellen Zellseparationsmediums werden die in der Körperflüssigkeit vorhandenen Zellen so aufgetrennt, daß die aufgrund ihrer Dichte zusammen mit den Tumorzellen angereicherten Lymphozyten keine Telomerase-Aktivität aufweisen.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Anreicherung von Tumorzellen aus einer Körperflüssigkeit, worin ein Zellseparationsmedium mit der Körperflüssigkeit überschichtet und zentrifugiert wird, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellseparationsmedium eine Dichte im Bereich von 1,055 bis $< 1,070$ g/ml aufweist.

Das Anreicherungsverfahren verwendet ein Zellseparationsmedium als diskontinuierlichen Gradienten, das mit der

Körperflüssigkeit überschichtet wird. Durch Zentrifugation werden die Zellen ihrer spezifischen Zelldichte nach aufgetrennt und können in einzelnen Fraktionen abgenommen werden. Der spezifische Dichtegrad des Zellseparationsmediums erlaubt eine fast vollkommene Trennung von Tumorzellen von den in den Körperflüssigkeiten befindlichen korpuskulären Anteilen, speziell den Zellen des roten und weißen Blutsystems. Darüber hinaus erlaubt es das Verfahren, Telomerase-positive von Telomerase-negativen hämatopoetischen Zellen zu trennen, wobei sich die angereicherten Tumorzellen nach der Zentrifugation in der gleichen Fraktion befinden wie die Telomerase-negativen hämatopoetischen Zellen, so daß eine anschließend nachgewiesene Telomerase-Expression in dieser Fraktion zweifelsfrei auf vorhandene Tumorzellen zurückgeführt werden kann.

Überraschend ist auch, daß durch die gegenüber dem Stand der Technik nur geringfügige Verringerung der Dichte des Zellseparationsmediums eine erhebliche Reduzierung der kontaminierenden Blutzellen erreicht wird. Dadurch wird die Gesamt-Zellzahl signifikant verringert, ohne daß signifikante Verluste an Tumorzellen auftreten, wodurch z.B. das Screening von mikroskopischen Präparaten erheblich vereinfacht und im klinischen Maßstab erst möglich wird.

Es wurde gefunden, daß eine besonders gute Trennleistung mit einem Zellseparationsmedium einer Dichte im Bereich von 1,060-1,067 g/ml, bevorzugt von 1,060-1,065 g/ml und besonders bevorzugt von etwa 1,065 g/ml erzielt wird.

Die Zentrifugation wird vorteilhaft bei ca. 1.000 x g über ca. 30 Minuten durchgeführt. Die Temperatur während der Zentrifugation beträgt vorzugsweise ca. 4°C. Insbesondere hat es sich als vorteilhaft erwiesen, wenn die Zentrifugation mit langsamer Beschleunigung und ohne Bremsen durchgeführt wird, damit das Zellseparationsmedium und die Körperflüssigkeit zu

Beginn der Zentrifugation bzw. die Fraktionen am Ende der Zentrifugation nicht miteinander vermischt werden.

Als Zellseparationsmedium läßt sich im Prinzip jede geeignete Flüssigkeit gewünschter Dichte verwenden. Das Zellseparationsmedium sollte nicht mit der Körperflüssigkeit oder den darin enthaltenen Zellen reagieren. Vorteilhaft kann beispielsweise Ficoll oder Percoll verwendet werden, wobei die Lösungen jeweils nach Anweisungen des Herstellers auf die gewünschte Dichte gebracht werden. Beispielsweise berechnet sich die Menge der zu verdünnenden Percoll-Stammlösung mit einer Dichte von 1,13 g/ml, die zur Herstellung von 100 ml einer Percoll-Arbeitslösung gewünschter Dichte (dd) benötigt wird, nach der Formel:

$$100 \text{ ml} \times (dd - 0,106 - 0,9) / 0,13.$$

10% der Percoll-Arbeitslösung gewünschter Dichte bestehen immer aus einer 1,5 M NaCl-Lösung, um eine physiologische Osmolarität zu gewährleisten. Die Differenz zwischen der nach der vorstehenden Formel berechneten Menge an Percoll-Stammlösung (Dichte 1,13 g/ml) und der Salzlösung zu 100 ml wird dann mit Wasser aufgefüllt.

Damit läßt sich eine Percoll-Arbeitslösung mit einer Dichte von 1,060 g/ml beispielsweise wie folgt herstellen:

| | |
|-----------------|--|
| 41,54 ml | der Percoll-Stammlösung (Dichte von 1,13 g/ml) |
| 48,46 ml | H ₂ O |
| <u>10,00 ml</u> | <u>1,5 M NaCl</u> |

100,00 ml Percoll-Arbeitslösung, dd 1,060 g/ml

Die angegebenen Dichten beziehen sich auf eine Temperatur von 20°C. Vorteilhaft werden die Arbeitslösungen bei Raumtemperatur

hergestellt und beispielsweise mit Hilfe von Marker-Beads einer definierten Dichte überprüft.

Bei der Körperflüssigkeit, aus der Tumorzellen angereichert werden sollen, kann es sich um jede menschliche oder tierische Körperflüssigkeit oder um eine Dispersion von Zellgewebe handeln. Hierbei handelt es sich beispielsweise um Blut, insbesondere peripheres Blut wie venöses oder arterielles Blut, Lymphe, Urin, Exsudate, Transudate, Spinalflüssigkeit, Samenflüssigkeit, Speichel, Flüssigkeiten aus natürlichen oder unnatürlichen Körperhöhlen, Knochenmark und dispergiertem Körpergewebe. Bei den Flüssigkeiten aus natürlichen Körperhöhlen kann es sich beispielsweise um seröse Flüssigkeiten wie Peritoneal- und Pleuraflüssigkeiten handeln, bei den Flüssigkeiten aus unnatürlichen Körperhöhlen kann es sich beispielsweise um Flüssigkeiten aus Zysten handeln.

Bevorzugte Körperflüssigkeiten sind Blut, Knochenmark, Lymphe, seröse Flüssigkeiten aus Körperhöhlen sowie Urin, wobei Blut und Urin besonders bevorzugt sind. Urin eignet sich insbesondere zur Anreicherung von Zellen von Blasentumoren.

Die bevorzugteste Körperflüssigkeit ist jedoch peripheres Blut, das vorteilhaft in einer gerinnungshemmenden Substanz abgenommen und vor dem Überschichten des Zellseparationsmediums mit einem Verdünnungsmittel verdünnt wird. Als gerinnungshemmende Substanzen werden bevorzugt EDTA oder Citrat eingesetzt, als Verdünnungsmedium eignet sich beispielsweise PBS. Das Blut wird vorzugsweise im Verhältnis von ca. 1:1 verdünnt. Als peripheres Blut eignet sich venöses oder arterielles Blut.

Die zu untersuchende Körperflüssigkeit wird entsprechend gängiger Standardprotokolle entnommen bzw. gesammelt. In Abhängigkeit von der Art der Körperflüssigkeit wird diese dann entweder zunächst mit einem Verdünnungsmittel, bevorzugt einem

Puffer, verdünnt oder direkt unverdünnt in einem Zentrifugationsgefäß über das Zellseparationsmedium geschichtet. Alternativ kann die Körperflüssigkeit zuvor bei beispielsweise 1.000 x g für ca. 10 Min. zentrifugiert und nach Resuspension der Zellen in einem Puffer über das Zellseparationsmedium geschichtet werden. Der bevorzugt verwendete Puffer ist Dulbecco PBS. Als Zentrifugationsgefäß eignet sich insbesondere ein silikonisiertes Zentrifugationsgefäß bevorzugt aus Kunststoff mit einer Kapazität von beispielsweise 1-500 ml. Das Zentrifugationsgefäß sollte verschließbar sein.

In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens werden der Körperflüssigkeit vor dem Überschichten eine oder mehrere Substanzen zugegeben, die eine Aggregation von Thrombozyten an Tumorzellen verhindern. Diese Substanzen können zum Beispiel mit dem als Verdünnungsmittel verwendeten Puffer zugesetzt werden. Als Substanzen, die eine unerwünschte Aggregation von Thrombozyten an Tumorzellen verhindern, eignen sich beispielsweise EDTA, Citrat und ACD-A (acid citrate dextrose). Zusätzlich oder statt dessen kann die Körperflüssigkeit vor dem Überschichten von Substanzen befreit werden, die eine Aggregation von Thrombozyten an Tumorzellen fördern. Hierbei handelt es sich beispielsweise um Ionen wie Magnesium- und Calciumionen.

Im Zentrifugationsgefäß wird das Zellseparationsmedium, das eine höhere Dichte als die zu untersuchende Körperflüssigkeit aufweist, vorgelegt, und anschließend mit der Körperflüssigkeit überschichtet. Je nach Größe des Zentrifugationsgefäßes und dem Volumen der Körperflüssigkeit, aus der die Tumorzellen angereichert werden sollen, kann das Zellseparationsmedium beispielsweise mit einem Volumen von 1-250 ml vorgelegt werden.

Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, wenn das untere Viertel des Zentrifugationsgefäßes nach der Zentrifugation und

vor der Abnahme der an Tumorzellen angereicherten Interphase kurzzeitig stark abgekühlt wird um Zell-Kontaminationen zu verhindern. Beispielsweise können die im Zellpellet befindlichen Erythrozyten und Leucozyten dadurch immobilisiert werden, daß das untere Viertel des Zentrifugationsgefäßes für 5-10 Minuten in flüssigem Stickstoff stark abgekühlt wird. Als Interphase wird vorliegend der Übergang zwischen dem Zellseparationsmedium und der darüberliegenden Körperflüssigkeit bezeichnet. In dieser Interphase reichern sich die Tumorzellen an und werden nach der Zentrifugation beispielsweise durch Absaugen dieser Phase gesammelt. Durch das starke Abkühlen des Zentrifugationsgefäßes wird ein Vermischen der Zellen aus den verschiedenen Phasen verhindert, wodurch falsch-positive Testergebnisse ausgeschlossen werden können.

Um einen möglichst einfachen Ablauf der Arbeiten zu sichern, kann in einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens die Zentrifugation in einem Gefäß durchgeführt werden, das durch eine Barriere, einen Filter oder ein Sieb, nachfolgend poröse Barriere oder Barriere genannt, in ein oberes und ein unteres Kompartiment geteilt ist, wobei das Zellsuspensionsmedium im unteren Kompartiment vorgelegt und die Körperflüssigkeit in das obere Kompartiment eingebracht wird. Hierdurch wird ein Vermischen der zu untersuchenden Körperflüssigkeit im oberen Kompartiment mit dem Zellseparationsmedium im unteren Kompartiment vor und nach dem Zentrifugationsschritt vermieden.

Die Position der porösen Barriere in dem Zentrifugationsgefäß kann dabei so gewählt werden, daß der Flüssigkeitsspiegel des Zellseparationsmediums entweder genau unterhalb, genau innerhalb oder genau oberhalb der porösen Barriere zu liegen kommt.

Die poröse Barriere kann beispielsweise eine Dicke von 1-10 mm, vorzugsweise ca. 5 mm aufweisen. Die poröse Barriere sollte

darüber hinaus eine Festigkeit aufweisen, die es ihr erlaubt den Zentrifugationskräften unbeschadet Stand zu halten.

Eine bevorzugte Verwendung finden Barrieren mit einer porösen Beschaffenheit, die es erlaubt, daß bei der Zentrifugation Flüssigkeit sowie die korpuskulären Bestandteile des Blutes, wie die Zellen des roten und weißen Blutsystems, nicht aber die Tumorzellen die poröse Barriere ungehindert passieren können. Dies hat zur Folge, daß das Zellseparationsmedium während der Zentrifugation durch die poröse Membran in das obere Kompartiment gedrängt wird und die Tumorzellen und Thrombozyten auf einer Ebene oberhalb der Barriere zu liegen kommen. Hierzu eignen sich insbesondere poröse Barrieren mit einer Porengröße von 20-100 μm , vorzugsweise 20-30 μm .

Die poröse Barriere kann aus jedem geeigneten Material bestehen. Beispielsweise eignen sich Kunststoff, Metall, Keramik oder eine Mischung oder spezielle Legierung dieser Stoffe. Es kann aber auch jedes andere natürliche oder künstliche, geeignete Material eingesetzt werden.

In einer ebenfalls bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht die poröse Barriere aus einem hydrophoben Material oder ist mit einem hydrophoben Material beschichtet.

Mit Hilfe der porösen Barriere kann die zu untersuchende Körperflüssigkeit in das Zentrifugationsgefäß gefüllt werden, ohne daß sie sich mit dem darunterliegenden Zellseparationsmedium vermischt und somit die Anreicherung beeinträchtigen oder unmöglich machen kann.

Nach der Zentrifugation befinden sich die in der Körperflüssigkeit vorhandenen Tumorzellen in der Interphase des oberen Kompartiments des Zentrifugationsgefäßes. Die Flüssigkeit oberhalb der Interphase kann dann zu etwa 80%

vorsichtig abgesaugt und verworfen werden. Bei dieser Restflüssigkeit handelt es sich beispielsweise bei der Verwendung von Blut als Körperflüssigkeit um ein Plasma/PBS-Gemisch, das die Serumproteine enthält.

Der verbleibende Überstand oberhalb der Barriere, in dem sich die Tumorzellen befinden, kann anschließend gesammelt und beispielsweise in ein frisches Zentrifugationsgefäß (vorzugsweise aus silikonisiertem Kunststoff und mit der gleichen Volumenkapazität wie das zuvor verwendete Zentrifugationsgefäß) überführt werden. Die poröse Barriere verhindert bei der Entnahme des verbleibenden Überstands ein Vermischen der Zellen des oberen und des unteren Kompartiments.

Vorteilhaft wird anschließend das obere Kompartiment des Zentrifugationsgefäßes beispielsweise zweimal mit einem Puffer nachgewaschen und dieser wird ebenfalls in das frische Zentrifugationsgefäß überführt. Als Puffer eignen sich beispielsweise Dulbeccos PBS (3,9 mM EDTA, pH 8,0 ohne Calcium und Magnesium) oder NaCl/10% ACD-A (Guidlines for the collection, processing and storage of human bone marrow and peripheral stem cells for transplantation, prepared by the BCSH Blood Transfusion Task. Transfus. Med. 1994; 4: 165-72) oder NaCl/5% ACD-A/1% Albumin). Nach einer weiteren Zentrifugation beispielsweise bei 1.000 x g über ca. 10 Min. bei einer Temperatur von ca. 4°C können die gesammelten Zellen beispielsweise den Tumorzellnachweismethoden zugeführt werden.

Um den nach der Zentrifugation die Tumorzellen enthaltenden Zellring an der Interphase zwischen Zellseparationsmedium und Körperflüssigkeit für die Entnahme aus dem Zentrifugationsgefäß besser sichtbar zu machen, hat es sich als vorteilhaft erwiesen, dem Zellseparationsmedium einen Farbstoff zuzugeben. Beispielsweise können zu 100 ml einer Percoll-Arbeitslösung 80 µl einer 5% Trypan Blau-Lösung zugegeben werden.



Bei Verwendung eines Zentrifugationsgefäßes mit poröser Barriere wird nach Entnahme der überstehenden Restflüssigkeit oberhalb der Interphase jedoch bevorzugt nicht nur die Interphase sondern die gesamte verbliebene Flüssigkeit oberhalb der porösen Barriere entnommen, nicht weil sich zwischen Interphase und poröser Barriere noch weitere Zellen befinden, sondern weil durch die Abnahme die im Zellring enthaltenen Zellen leicht durchmischt werden können. Um keine Zellen aus dem oberen Kompartiment zu verlieren wird dieses vorteilhaft noch zweimal mit Puffer (z.B. PBS) gewaschen.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können zirkulierende Tumorzellen und insbesondere zirkulierende Tumorzellen von soliden Tumoren, d.h. von nicht-hämatologischen Tumoren, angereichert werden oder hämatologische Tumorzellen, d.h. Tumorzellen des roten und weißen Blutsystems.

Mit dem erfindungsgemäßen Tumorzellenanreicherungsverfahren können Tumorzellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte nahezu vollständig von den korpuskulären Bestandteilen von Körperflüssigkeiten wie z.B. den Zellen des roten und weißen Blutsystems getrennt, konzentriert und beispielsweise einer der bekannten Tumorzellennachweisverfahren zugeführt werden.

Die Methoden zum Nachweis von Tumorzellen umfassen das gesamte Spektrum der gängigen Diagnostik. Beispiele hierfür sind die mikroskopischen, immunhistologischen, biochemischen und/oder molekularbiologischen Verfahren. Beispielsweise können die Tumorzellen nach der Anreicherung als ganze Zellen oder als Zellenbestandteile direkt oder nach Zellkultur und Expansion der Tumorzellen durch morphologische, immunhistologische, biochemische und/oder molekularbiologische Verfahren nachgewiesen werden. Diese Verfahren ermöglichen den Nachweis einer ganzen Zelle, der spezifischen Aktivität einer Zelle oder den Nachweis von spezifischen Bestandteilen einer ganzen Zelle. Beispiele von Bestandteilen einer ganzen Zelle sind u.a.



Proteine und Glykoproteine der Membran, des Zytoplasmas oder des Zellkerns, sowie die Chromosomen, spezifische Abschnitte von Chromosomen bis hin zu Nukleinsäuresequenzen, wie DNA, RNA und cDNA.

Beispiele direkter Zellaufweisverfahren sind u.a. sämtliche Formen der Mikroskopie einschließlich der Färbung von Zellen oder Zellbestandteilen. Beispiele direkter Färbung sind die Methylenblaufärbung oder die Färbung durch spezifische Antikörper, die gegen spezifische Bestandteile der Zelle, wie der Zellmembran, das Zytoplasma oder der Zellkern gerichtet sind und an denen Markierungssignale wie z.B. fluoreszierende Farbstoffe gekoppelt sind. Nachweisverfahren sind u.a. Durchflußzytometrie (FACS), ELISA und Western Blotting. Weitere Verfahren zum Nachweis von Zellbestandteilen sind u.a. die Detektionsverfahren von Nukleinsäuren mit Hilfe von markierten Sonden, z. B. FISH, in situ Hybridisierung, Northern, Southern und Southern Blotting oder differential display sowie u.a. die Amplifikationsverfahren von Nukleinsäuren u.a. die PCR, RT-PCR, in situ RT-PCR und NASBA.

Weiterhin ist es vorteilhaft, Verfahren einzusetzen, die eine spezifische Bindung eines Antikörpers an ein Protein oder eines Oligonukleotids an eine Nukleinsäure (DNA, RNA oder cDNA) durch eine Signalamplifizierung sichtbar machen. Ein Beispiel hierfür ist der Einsatz spezifischer Dendrimere (Polyprobe) (vgl. US Patent 5,487,973 und Nilsen, T.W., Grayzel, J. und Prensky, W. (1997) J. theor. Biol. 187: 273-284). Dendrimere sind hochverzweigte Strukturen, die vorzugsweise aus Nukleinsäuren bestehen und aus der sequenziellen Hybridisierung monomerer Strukturen hervorgehen. Ein Monomer ist ein Heterodimer, der aus zwei Einzelstrang-Nukleinsäuren besteht, die eine Doppelstrang-Taille und vier Einzelstrang-Armen bilden. Ein Dendrimer ist aus der sequenziellen Bindung solcher Monomere in mehreren Bindungsebenen zusammengesetzt: Die erste Bindungsebene besteht aus vier Monomeren mit zwölf



Einzelstrang-Armen. Die zweite Ebene besteht aus zwölf Monomeren mit 36 Einzelstrang-Armen. Die sechste Ebene besteht aus 972 Monomeren mit 2916 freien Einzelstrang-Armen. An einen der Einzelstrang-Arme können zum einen spezifische Antikörper oder spezifische Sonden wie Nukleinsäuren angekoppelt werden. An den anderen Einzelstrang-Arm hingegen können spezifische Markierungssignale wie z.B. fluoreszierende Farbstoffe, oder radioaktive Substanzen gekoppelt werden. Der Einsatz der Dendrimere zum Nachweis von seltener DNA oder RNA kann entweder direkt oder indirekt nach Amplifikation durch z.B. PCR, RT-PCR oder NASBA erfolgen.

Die angeschlossenen Nachweisverfahren können auf folgenden Gebieten zum Einsatz kommen:

Der Nachweis der Tumorzellen kann direkt als Tumormarker eingesetzt werden.

In Staginguntersuchungen kann die Anzahl der nachgewiesenen zirkulierenden Tumorzellen mit dem klinischen Bild korreliert und ein individuelles Tumorstaging festgelegt werden. Nach Entfernung des Primärtumors kann der Patient regelmäßigen Rezidivkontrollen unterzogen und bei positivem Befund sofort behandelt werden. Weitere Anwendungsmöglichkeiten sind der Nachweis von residualen Tumorzellen im Knochenmark von Patienten, die sich einer Hochdosis-Strahlentherapie unterziehen müssen oder von zirkulierenden Tumorzellen im Rahmen von ex-vivo und in-vivo Gentherapieansätzen.

Durch die Gewinnung von zirkulierenden Tumorzellen können Therapien auf ihre Wirksamkeit hin überprüft und gegebenenfalls abgeändert werden. Dies ist insbesondere dadurch möglich, daß man nach Gewinnung von Tumorzellen, direkt oder nach Kultur und Expansion, die individuelle Resistenzlage der Tumorzellen auf ein Zytostatikum überprüfen und alternative Präparate austesten



kann. Außerdem besteht die Möglichkeit an den gewonnenen Tumorzellen neue Therapeutika zu testen.

Einen besonderen Stellenwert wird dem Verfahren im Rahmen von Tumurvorsorgeuntersuchungen beigemessen, da mit einer erheblich früheren Diagnose und bei sofortiger Therapie mit längeren Überlebensraten zu rechnen ist. Weitere Anwendungen liegen in der Tumorstoffwechselherstellung und der Gentherapie.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch ein Verfahren zum Nachweis von Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit, worin die Tumorzellen wie vorstehend beschrieben aus der Körperflüssigkeit angereichert werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit zur Anreicherung von Tumorzellen aus einer Körperflüssigkeit, der zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahren geeignet ist. Hierzu umfaßt der Kit ein Zellseparationsmedium, das eine Dichte im Bereich von 1,055 bis $< 1,070$ g/ml aufweist, bevorzugt im Bereich von 1,060 bis 1,067 g/ml, bevorzugter von 1,060 bis 1,065 g/ml und besonders bevorzugt von etwa 1,065 g/ml, sowie gegebenenfalls ein Zentrifugationsgefäß.

Um das routinemäßige Arbeiten mit dem Kit zu erleichtern, kann das Zentrifugationsgefäß eine poröse Barriere mit einer Dicke von 1-10 mm, vorzugsweise ca. 5 mm aufweisen, die das Zentrifugationsgefäß in ein oberes und ein unteres Kompartiment unterteilt. Die poröse Barriere kann vorteilhaft eine Porengröße von 20-100 μ m, vorzugsweise 20-30 μ m aufweisen und besteht bevorzugt aus einem hydrophoben Material.

Die Größe des in dem Kit enthaltenen Zentrifugationsgefäßes sollte an die Menge der Körperflüssigkeit angepaßt sein, aus der die Tumorzellen angereichert werden sollen. Beispielsweise kann das Zentrifugationsgefäß ein Volumen von 1-500 ml, bevorzugt 1-50 ml und besonders bevorzugt 1 bis 10 ml



aufweisen. Bevorzugt ist das Zentrifugationsgefäß verschließbar.

Besonders vorteilhaft befindet sich das Zellseparationsmedium in dem Kit bereits im unteren Kompartiment des Zentrifugationsgefäßes, damit dieses bei Routineuntersuchungen einfach und schnell eingesetzt werden kann.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt der Kit ein Zellseparationsmedium, das mit einem Farbstoff versetzt ist, der die Interphase zwischen Zellseparationsmedium und Interphase nach der Zentrifugation leichter sichtbar macht.

Das erfindungsgemäße Verfahren bietet den Vorteil, daß Telomerase-positive hämatopoetische Zellen einfach und sicher von den anzureichernden Tumorzellen abgetrennt werden, so daß in anschließenden Nachweisverfahren keine falsch-positiven Ergebnisse durch Telomerase-aktive nicht-Tumorzellen erhalten werden. Darüber hinaus sind nur wenige Arbeitsschritte für die Anreicherung und Isolierung von Tumorzellen aus Körpergewebe notwendig, so daß dadurch die Prozessierung von größeren Mengen von Probenmaterial möglich wird. Die Kosten für die notwendigen Materialien sind beispielsweise gegenüber der Verwendung spezifischer Antikörper und der anschließenden Trennung mittels geeigneter Apparaturen signifikant geringer.

Darüber hinaus zeigte die Untersuchung von 10 unterschiedlichen Zelllinien, die von Tumorgeweben, wie Melanom, Prostata-, Brust-, Lungen-, Leber- und Colorektalkarzinomen abgeleitet waren, daß die Zellen all dieser Zelllinien in ihrer Mehrzahl durch das erfindungsgemäße Verfahren angereichert wurden.

Von den anliegenden Figuren zeigt:

Figur 1 das Ergebnis einer RT-PCR-Analyse von Blut eines gesunden Spenders (A) und Blut des gleichen Spenders gemischt



mit GFP-transfizierten Zellen der Melanom-Zelllinie T289 (B, C) nach Tumorzellenanreicherung mit einem Zellseparationsmedium einer Dichte von 1,070 g/ml,

Figur 2 das Ergebnis einer RT-PCR-Analyse von Blut gesunder Spender, das mit Tumorzellen einer Prostata-Karzinom- (A) und Mamma-Karzinom-Zelllinie (B) gemischt wurde, nach Tumorzellenanreicherung mit einem Zellseparationsmedium einer Dichte von 1,065 g/ml, und

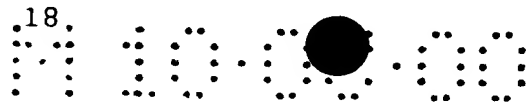
Figur 3 die Wiederfindungsrate von GFP-transfizierten Melanomzellen, die zu Blut unterschiedlicher (A, B) gesunder Spender gemischt wurden, nach Anreicherung mit einem Zellseparationsmedium einer Dichte von 1,065 g/ml.

Figur 4 zeigt ein Flußdiagramm für die RT-PCR.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern.

Beispiel 1

In einem silikonisierten Kunststoff-Zentrifugationsgefäß wurde venöses Blut (5-20 ml), mit EDTA versetzt (3,9 mM Endkonzentration, pH 8,0) und mit 1 Volumen PBS gemischt. Das Blut/PBS-Gemisch wurde anschließend auf 5-10 ml Percoll mit einer Dichte von 1,065 g/ml gegeben und bei langsamer Beschleunigung und ohne Bremse für 30 min. bei 1.000 x g und 4°C zentrifugiert. Das untere Viertel des Zentrifugationsgefäßes wurde anschließend für 5-10 min in flüssigem Stickstoff inkubiert. Dadurch wurde während des Absaugens der Zellen, die sich an der Interphase im Übergang zwischen dem Percoll und dem darüberliegenden Plasma/PBS-Gemisch befanden, eine Kontamination mit Zellen des Pellets verhindert. Die Zellen der Interphase, bei denen es sich vorwiegend um Thrombozyten und um im Blut zirkulierende



Tumorzellen handelte, wurden anschließend in ein neues silikonisiertes Kunststoff-Zentrifugationsgefäß übertragen und für 10 min bei 1.000 x g und 4°C zentrifugiert. Für die anschließende RT-PCR-Untersuchung wurde das Zellpellet in einem Guanidium-Isothiocyant-Puffer aufgenommen, wodurch die Zellen lysiert wurden und einer RNA-Isolierung unterzogen werden konnten.

Beispiel 2

Mit Hilfe von sogenannten Spiking-Experimenten, bei denen Tumorzellen verschiedener Zelllinien zum Blut normaler Spender gemischt wurden und die Tumorzellen anschließend re-isoliert und in der RT-PCR untersucht wurden, wurde gezeigt, daß in Abhängigkeit der verwendeten Zelllinie die Telomerase-Aktivität von etwa 1-4 gespikter Tumorzellen/ml Blut nachgewiesen werden kann. Die RT-PCR wurde analog zu der in Beispiel 4 beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt.

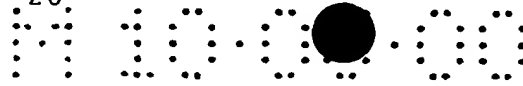
Hierzu wurden die Zellen der zu spikenden Tumorzelllinien entsprechend der Angaben des Herstellers (ATCC, *American Tissue Cell Culture*) bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden anschließend trypsiniert und in Medium (RPMI 1640) gewaschen. Nach Entnahme eines 10 µl Aliquots, das 1:1 mit Tryptan-Blau gemischt wurde, wurden die lebenden Zellen in einer Zählkammer bestimmt und die entsprechende Zellkonzentration wurde berechnet. Anschließend wurde die Zellsuspension verdünnt und ein Volumen, das einer bestimmten Zellzahl entspricht, mit dem Blut gesunder Blutspender gemischt. Als Kontrolle diente Blut dem keine Tumorzellen zugesetzt wurden. Die Anreicherung der gespikten Tumorzellen wurde einmal zum Vergleich mit einem Zellseparationsmedium einer Dichte von 1,070 g/ml und nach dem erfindungsgemäßen Verfahren durchgeführt. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden anschließend mikroskopische, durchflußzytometrische und RT-PCR-Analysen durchgeführt.

a) Vergleichsversuch

Figur 1 zeigt das Ergebnis einer RT-PCR-Analyse von 20 ml Blut eines gesunden Spenders (A) und 20 ml Blut des gleichen Spenders gemischt mit GFP-transfizierten Zellen der Melanom-Zelllinie T289 (B, C). Das Blut wurde auf Percoll einer Dichte von 1,070 g/ml geschichtet, zentrifugiert und anschließend wurden die Zellen analysiert. Die katalytische Untereinheit der Telomerase (hTRT) ist im normalen Blut nicht nachweisbar (A), während bei 1 und 2 gespikten Melanomzellen pro ml Blut hTRT nachweisbar ist (B, C). Bei der verwendeten Percoll-Dichte von 1,070 g/ml sind jedoch noch hinreichend viele Telomerase-aktive Leukozyten in der Interphase vorhanden, wodurch die RNA-Komponente (hTR) auch im ungespikten Blut nachweisbar ist. Für die Präsenz von aktivierten und wahrscheinlich deshalb auch Telomerase-aktiven Leukozyten in der Fraktion der isolierten Zellen spricht auch die Tatsache, daß CD69, ein früher Aktivierungsmarker in B- und T-Zellen, in allen Blutproben nachweisbar ist (A-C). Der Tumormarker CEA (Carcinoembryonic Antigene) ist sowohl im ungespikten als auch im gespikten Blut negativ (A-C). GFP (Green Fluorescent Protein), der als zusätzlicher Marker für die gespikten Tumorzellen verwendet wurde, ist im ungespikten Blut nicht nachweisbar (A). Da nur etwa 50% der transfizierten T289-Melanomzellen GFP exprimieren, ist das Protein nur in bis zu 2 gespikten Tumorzellen pro ml Blut nachweisbar (B). Aktin diente als RT-PCR-Positivkontrolle (Aktin) und im Ansatz ohne RT-Reaktion als Negativkontrolle (Aktin ØRT). Die PCR-Amplifikation genomischer DNA untransfizierter T289-Zellen führt mit den spezifischen Primerpaaren für hTRT, GFP und CD69 zu keinen Amplifikaten.

b) erfindungsgemäßer Versuch

Figur 2 zeigt RT-PCR-Analysen von Blut gesunder Spender das mit Tumorzellen einer Prostata-Karzinom- (A) und Mamma-Karzinom-Zelllinie (B) gemischt, auf Percoll einer Dichte von 1,065 g/ml



geschichtet, zentrifugiert und anschließend analysiert wurde. Die RNA-Komponente der Telomerase (hTR) ist im Unterschied zu der Verwendung von Percoll mit einer Dichte von 1,070 g/ml im ungespikten Blut nicht nachweisbar (vgl. Fig. 1). In den Proben mit 2 gespikten Prostata-Karzinomzellen (A) bzw. mit 4 gespikten Mamma-Karzinomzellen (B) pro ml Blut kann hTR nachgewiesen werden (schwarzer Pfeil). Im Unterschied zur Melanom-Zelllinie T289 konnte bei diesen Tumorzellen keine (A) bzw. erst bei 10^4 Tumorzellen (B) eine Expression der katalytischen Untereinheit (hTERT) nachgewiesen werden. Weder der Prostatazell-spezifische Marker PSA (Prostate Specific Antigene) noch der Epithelzell-spezifische Marker CK20 (Cytokeratin 20) ist in den entsprechenden Tumorzellen nachweisbar. Aktin dient als RT-PCR-Positivkontrolle.

Figur 3 zeigt die Wiederfindungsraten von GFP-transfizierten Melanomzellen (T289), die zu Blutproben gesunder Spender gemischt (gespikt) wurden. Die gespikten Blutproben wurden anschließend auf Percoll einer Dichte von 1,065 g/ml geschichtet, zentrifugiert und die Anzahl der re-isolierten Tumorzellen (Wiederfindung) wurde mikroskopisch (-●-) und/oder durchflußzytometrisch (-▲-) bestimmt. Da nur etwa 75% für Probe A bzw. 50% für Probe B der GFP-transfizierten T289-Zellen im Durchflußzytometer nachweisbar waren, wurden die Wiederfindungsraten entsprechend korrigiert. Die Wiederfindungsrate gespikter Tumorzellen ist abhängig vom jeweiligen Blutspender (die Blutproben von A) und B) stammen von unterschiedlichen Spendern), der verwendeten Zelllinie und verhält sich umgekehrt proportional zur Anzahl der gespikten Tumorzellen. Möglicherweise führt eine Abstoßungs-Reaktion der entsprechenden hämatopoetischen Zellen zur Lyse, Aggregation und schließlich zum Verlust der gespikten allogenen Tumorzellen. B) zeigt darüber hinaus, daß die Anzahl der tatsächlich gespikten Tumorzellen (-■-) zwischen 6% - 37% geringer ist als die theoretisch berechnete Anzahl gespikter Tumorzellen (-◆-).

Unter Hinzunahme hier nicht dargestellter Untersuchungen mit Lungen- und Mamma-Karzinomzellen ergibt sich eine durchschnittliche Wiederfindungsrate mit der erfindungsgemäßen Anreicherungsmethode von $46\% \pm 20\%$ für 4-512 gespikte Zellen ($n=16$) und für ≤ 50 gespikte Zellen von $54\% \pm 20\%$ ($n=15$).

Damit liegt die Wiederfindungsrate des erfindungsgemäßen Tumorzellenanreicherungsverfahrens etwa im Bereich von magnetischen Zell-Separatoren wie MACS für die eine Wiederfindungsrate von etwa 30-58% angegeben wird.

Beispiel 3

Erste klinische Untersuchungen bei Melanom-Patienten haben gezeigt, daß in 43% der Patienten mit akuten Metastasen und in 16% der Patienten ohne offenkundige akute Tumorerkrankung (beispielsweise nach Resektion der Tumoren bzw. nach Therapie) die Telomerase in den mit dem erfindungsgemäßen Verfahren angereicherten disseminierten zirkulierenden Tumorzellen des Blutes nachgewiesen werden konnte. Parallel untersuchte Blutproben von 10 gesunden Spendern waren dagegen negativ.

Damit zeigte bereits diese Studie an Melanom-Patienten eine eindeutige Korrelation der Telomerase-Aktivität von disseminierten zirkulierenden Tumorzellen im Blut und dem Metastasen-Status der entsprechenden Tumor-Patienten.

Beispiel 4

4.1 Isolierung von zellulärer RNA

Die Isolierung von totaler zellulärer RNA erfolgte nach Standardverfahren [Chomczynski et al. (1987) Anal Biochem 162, 156; Sambrook, J. et al. (1989). Cold Spring Harbor, New York, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press]. Peripheres Blut

wurde wie in Figur 4 gezeigt sofort nach Abnahme in RNA-Lysispuffer (4 M Guanidinium Isothiocyanat; 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5; 1% Mercaptoethanol) überführt und homogenisiert. Die Gemische wurden entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -70°C gelagert.

4.2 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR wurde mit dem GeneAmp® RNA-PCR-Kit (Perkin Elmer) nach Vorgaben des Herstellers wie in Figur 4 gezeigt durchgeführt. Aliquote der isolierten totalen RNA von peripherem Blut und Zelllinien wurden jeweils zuvor mit 4U DNase und 40U RNase Inhibitor (Boehringer, Mannheim) in 36 µl Ansätzen (in 100 mM Tris-HCl, pH 8.3; 50 mM KCl; 5 mM MgCl₂, 1mM dNTP-Mix und 2,5 mM Random Hexamers) bei 37°C für 30 Minuten und bei 75°C für 10 Minuten hydrolysiert und anschließend die DNase für 10 Minuten bei 90°C inaktiviert und dann das Reaktionsgemisch sofort auf Eis gegeben.

Die beiden Oligonukleotid-Primer:

5' CTACCGGAAG AGTGTCTGGA GCAAGTTGCA AAGC 3' (hTRT1) und
5' GGCATACCGA CGCACGCAGT ACGTGTTCTG 3' (hTRT2)

wurden nach der von Nakamura et al. veröffentlichten Sequenz, kodierend für die katalytische Untereinheit der menschlichen Telomerase (Nakamura et al. (1997). Science 277: 955-9) entworfen und mit einem Applied Biosystem 380A Synthesizer synthetisiert. Die Spezifität der hTRT1- und hTRT2-Primer wurde mittels Computer gestützter Homologieanalyse an den Nukleinsäuresequenzen in den GenBank-, EMBL-, DDBJ- und PDB-Datenbanken mittels BLASTN 1.4.9 MP [Altschul, S. F. et al. (1990). J Mol Biol 215: 403-410] überprüft.

Zur Abstimmung der Amplifikationsmengen wurden für jedes Experiment gleiche RNA-Mengen für die RT-Reaktion eingesetzt. Um eine Kontamination der RNA Präparationen mit genomischer DNA auszuschließen, wurde jede mit DNase hydrolysierte RNA-haltige Probe zuerst der unten beschriebenen PCR unterzogen und auf Amplifikation hin überprüft. Die RNA-haltige Probe, bei der kein Amplifikationsprodukt nachweisbar war, wurde für die folgenden cDNA-Synthese- und PCR-Schritte eingesetzt. Als interne Standardkontrolle wurden Oligonukleotid-Primer für β -Aktin und den TCR eingesetzt. Die Reverse Transkriptase-Reaktion wurde an 18 μ l des DNase Verdauers unter Zugabe von 50U MuLV Reverser Transkriptase und 40U RNase Inhibitor bei 42°C für 30 Minuten durchgeführt und die Reaktion bei 99°C für 5 Minuten abgebrochen. In den Negativkontrollen wurden statt der Enzyme 4 μ l Wasser zugesetzt.

Die PCR wurde wie in Figur 4 gezeigt an 5 μ l der cDNA-Reaktion nach folgendem Programm durchgeführt: (97°C: 15 Sekunden vorwärmen); (97°C: 15 Sekunden, 70°C: 30 Sekunden [minus 0.5°C pro Zyklus], 72°C: 30 Sekunden) 10 Zyklen; (94°C: 15 Sekunden, 65°C: 30 Sekunden [minus 0.5°C pro Zyklus], 72°C: 30 Sekunden) 20 Zyklen; (94°C: 15 Sekunden, 50°C: 30 Sekunden 72°C: 30 Sekunden [plus 15 Sekunden Extension pro Zyklus], 10 Zyklen; (72°C: 7 Minuten, finale Extension).

Die Amplifikationsprodukte wurden gelelektrophoretisch auf 1.5%igem TAE Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht visualisiert und fotodokumentiert.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Anreicherung von Tumorzellen aus einer Körperflüssigkeit, worin ein Zellseparationsmedium mit der Körperflüssigkeit überschichtet und zentrifugiert wird, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellseparationsmedium eine Dichte im Bereich von 1,055 bis $< 1,070$ g/ml aufweist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellseparationsmedium eine Dichte im Bereich von 1,060-1,067 g/ml und bevorzugt von etwa 1,065 g/ml aufweist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Zentrifugation bei ca. $1.000 \times g$ über ca. 30 Minuten durchgeführt wird.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellseparationsmedium Percoll oder Ficoll ist.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Körperflüssigkeit vor dem Überschichten eine oder mehrere Substanzen zugegeben werden, die eine Aggregation von Thrombozyten an Tumorzellen verhindern, und/oder die Körperflüssigkeit vor dem Überschichten von Substanzen befreit wird, die eine Aggregation von Thrombozyten an Tumorzellen fördern.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Körperflüssigkeit peripheres Blut ist.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das periphere Blut in einer gerinnungshemmenden Substanz abgenommen und vor dem Überschichten des Zellseparationsmediums mit einem

Verdünnungsmedium bevorzugt im Verhältnis von ca. 1:1 verdünnt wird.

8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß das periphere Blut venöses oder arterielles Blut ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß die Körperflüssigkeit ausgewählt ist aus Lymphe, Urin, Exsudaten, Transudaten, Spinalflüssigkeit, Samenflüssigkeit, Speichel, Flüssigkeiten aus natürlichen oder unnatürlichen Körperhöhlen, Knochenmark und dispergiertem Körpergewebe.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das untere Viertel des Zentrifugationsgefäßes nach der Zentrifugation und vor der Abnahme der an Tumorzellen angereicherten Interphase stark abgekühlt wird, um ein Vermischen der Zellen in den verschiedenen Schichten zu verhindern.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Zentrifugation in einem Gefäß durchgeführt wird, das durch eine poröse Barriere, einen Filter oder ein Sieb in ein oberes und ein unteres Kompartiment geteilt ist, wobei das Zellsuspensionsmedium im unteren Kompartiment vorgelegt und die Körperflüssigkeit in das obere Kompartiment eingebracht wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die poröse Barriere, der Filter oder das Sieb eine Dicke von 1-10 mm, vorzugsweise ca. 5 mm aufweisen.

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß die poröse Barriere, der Filter oder das Sieb eine Porengröße von 20-100 μm , vorzugsweise 20-30 μm aufweisen.



14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11-13, dadurch gekennzeichnet, daß die poröse Barriere, der Filter oder das Sieb aus einem hydrophoben Material bestehen oder mit einem hydrophoben Material beschichtet sind.
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellseparationsmedium einen Farbstoff enthält, der das Zellseparationsmedium von der darüberliegenden Körperflüssigkeit farblich unterscheidbar macht und dadurch die Lokalisation der Interphase vereinfacht.
16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß nicht-Tumorzellen, die eine Telomerase-Aktivität aufweisen, von Telomerase-positiven Tumorzellen abgetrennt werden.
17. Verfahren zum Nachweis von Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit, worin die Tumorzellen durch ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1-16 angereichert werden.
18. Kit zur Anreicherung von Tumorzellen aus einer Körperflüssigkeit, umfassend ein Zellseparationsmedium, das eine Dichte im Bereich von 1,055 bis $< 1,070$ g/ml aufweist, sowie gegebenenfalls ein Zentrifugationsgefäß.
19. Kit nach Anspruch 18, worin das Zellseparationsmedium eine Dichte im Bereich von 1,060 bis 1,067 g/ml und vorzugsweise von etwa 1,065 g/ml aufweist.
20. Kit nach einem der Ansprüche 18 oder 19, worin das Zentrifugationsgefäß eine poröse Barriere, einen Filter oder ein Sieb mit einer Dicke von 1-10 mm, vorzugsweise ca. 5 mm aufweist, die das Zentrifugationsgefäß in ein oberes und ein unteres Kompartiment unterteilen.

21. Kit nach Anspruch 20, worin die poröse Barriere, der Filter oder das Sieb eine Porengröße von 20-100 μm , vorzugsweise 20-30 μm aufweisen.

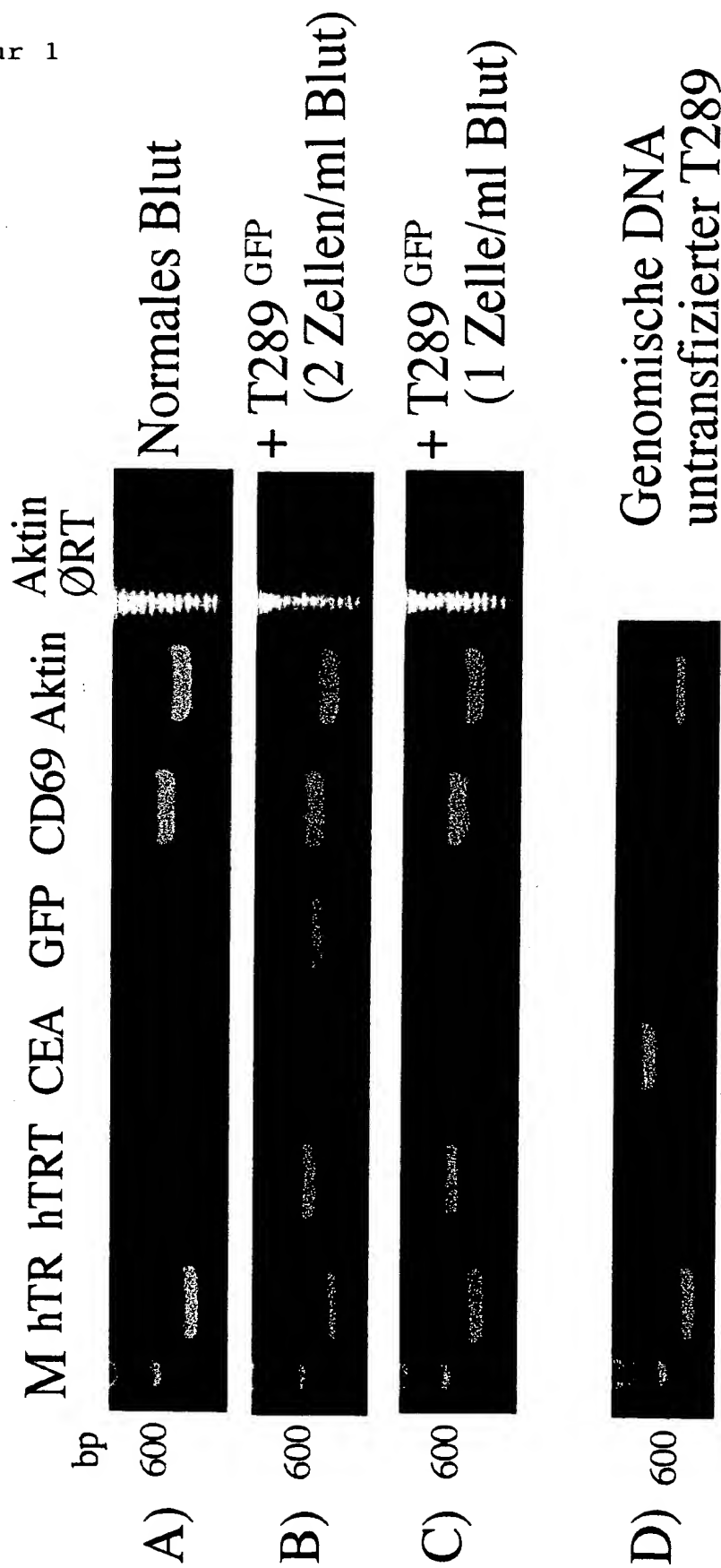
22. Kit nach Anspruch 20 oder 21, worin sich das Zellseparationsmedium im unteren Kompartiment des Zentrifugationsgefäßes befindet.

Zusammenfassung

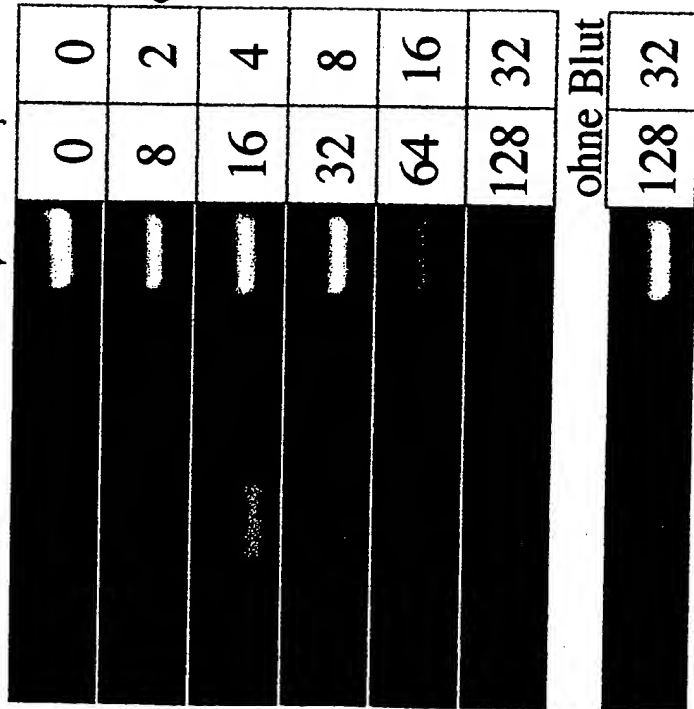
Verfahren zur Anreicherung von Tumorzellen aus einer Körperflüssigkeit und dazu geeigneter Kit

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Anreicherung von Tumorzellen aus einer Körperflüssigkeit, worin ein Zellseparationsmedium spezifischer Dichte mit der Körperflüssigkeit überschichtet und zentrifugiert wird. Ein für dieses Verfahren geeigneter Kit wird ebenfalls offenbart.

Figur 1

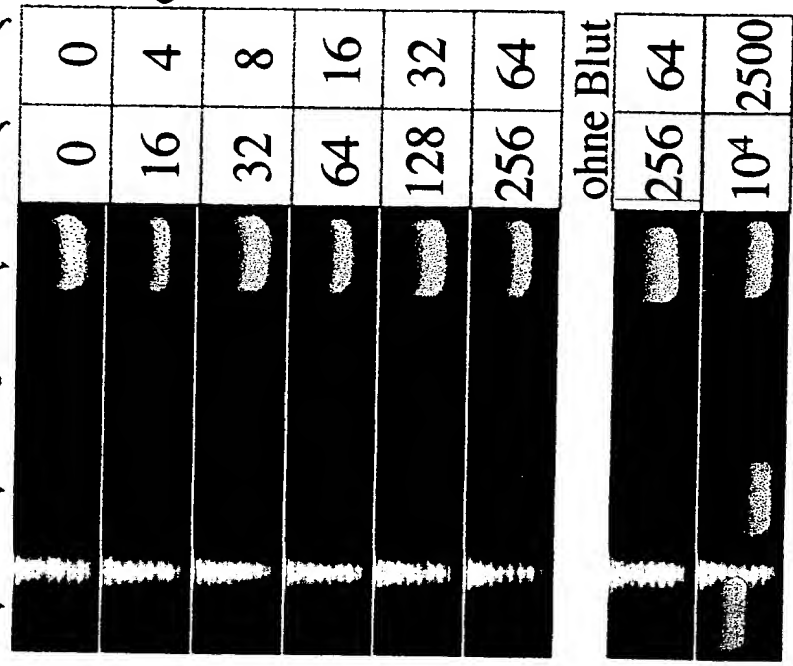


hTRT
 hTR
 CK20
 Aktin
 Tumorzellen
 je 4ml Blut
 je PCR-Ansatz



Prostata-Karzinom (PC-3)

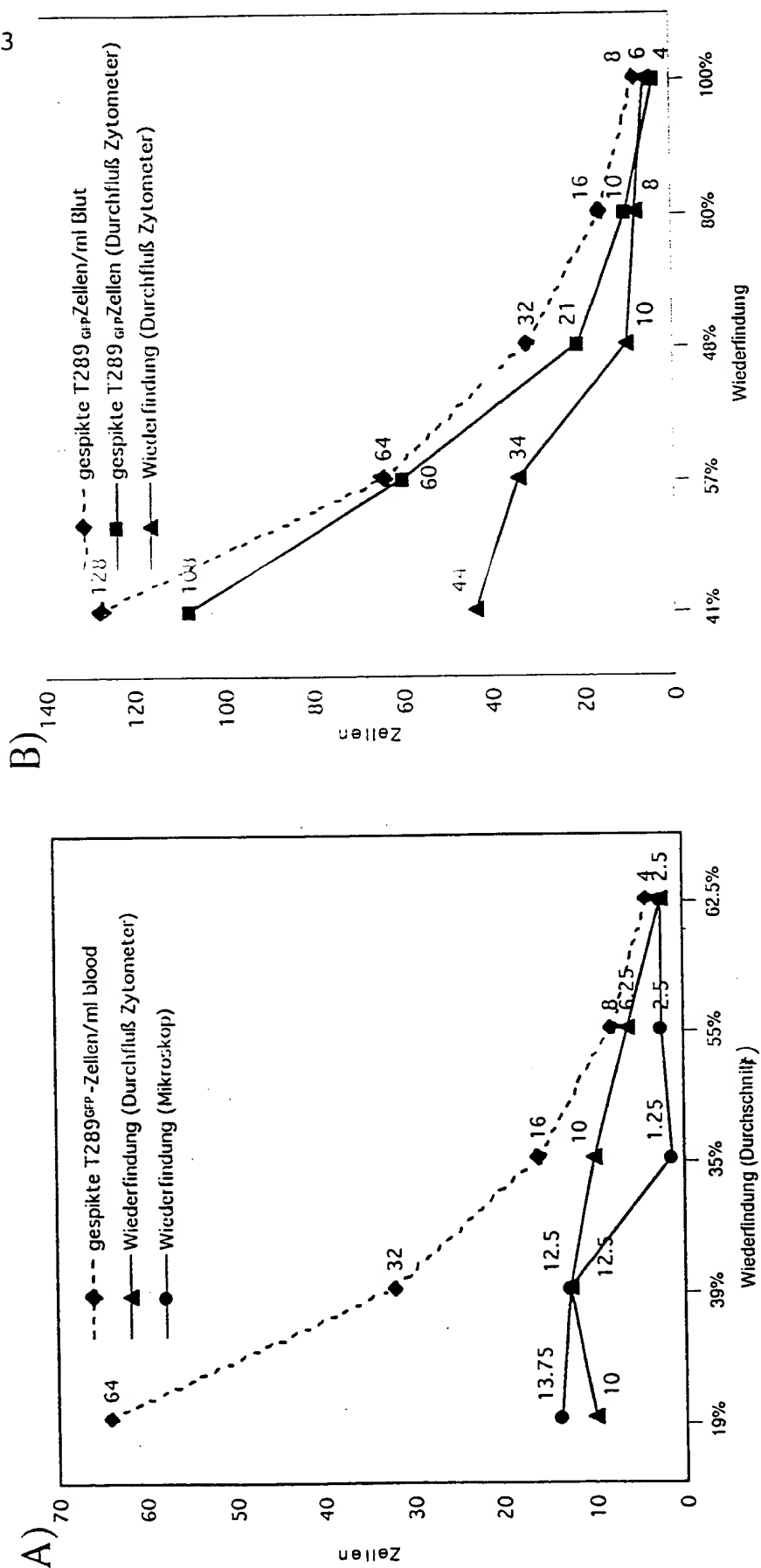
hTRT
 hTR
 CK20
 Aktin
 Tumorzellen
 je 4ml Blut
 je PCR-Ansatz



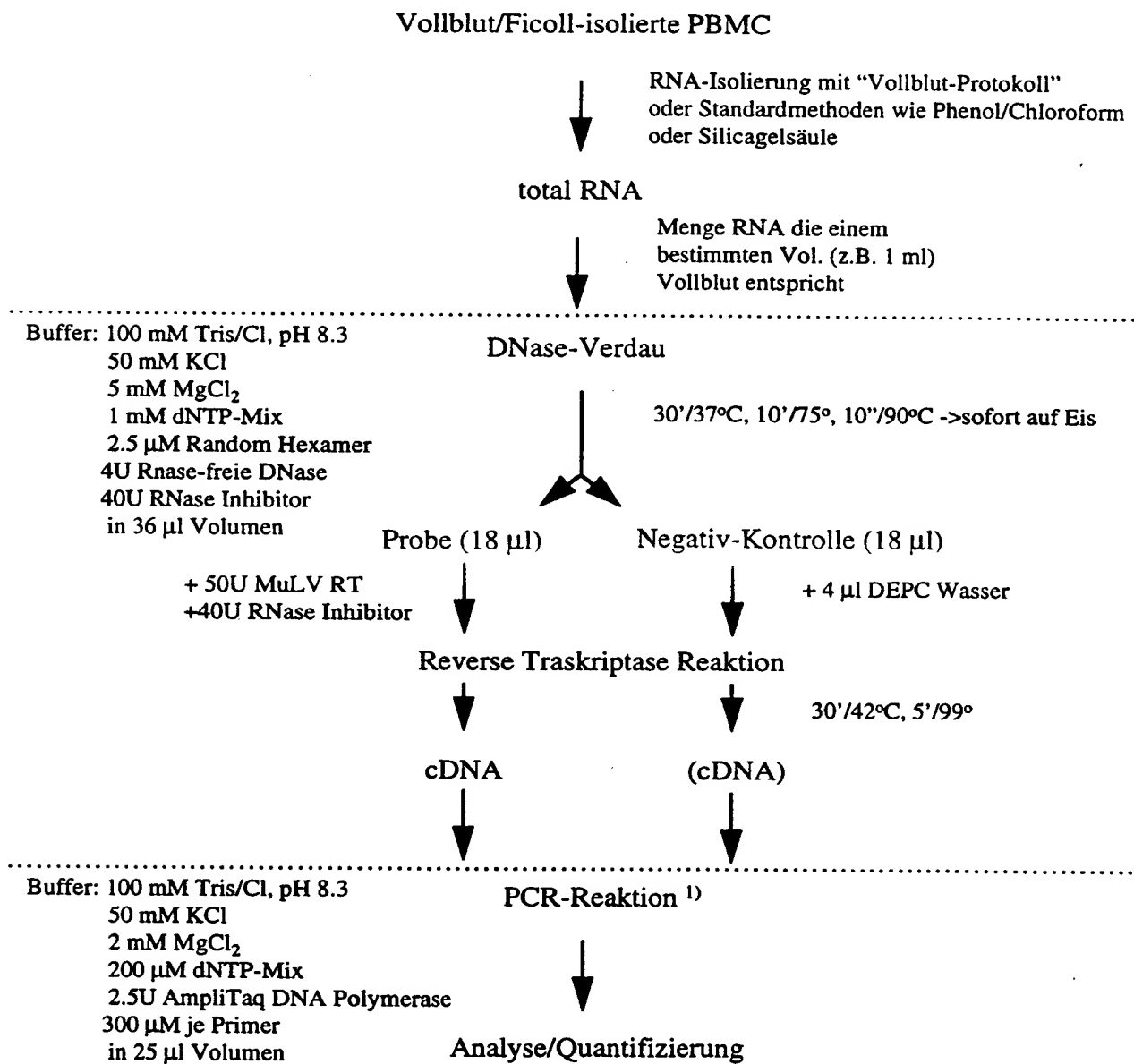
Mamma-Karzinom (MD MB-435s)

Figur 2

Figur 3



Figur 4



1) PCR-Konditionen:

15''/97°C (15''/97°C, 30''/70°C, -0.5°C/cycle, 30''/72°C) x10
(15''/94°C, 30''/65°C, -0.5°C/cycle, 30''/72°C) x20
(15''/94°C, 30''/50°C, 30'' (ext. 15''/cycle) /72°C) x10
7'/72°C

